

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

GENETIČKA VARIJABILNOST I STRUKTURA POPULACIJA VRSTE
Campanula pyramidalis L. – PREGLED LITERATURE

GENETIC VARIABILITY AND STRUCTURE OF POPULATIONS OF
Campanula pyramidalis L. - LITERATURE SURVEY

SEMINARSKI RAD

Paolo Bartolić

Preddiplomski studij Znanosti o okolišu
Undergraduate Study of Enviromental Sciences

Mentor: prof. dr. sc. Zlatko Liber

Zagreb, 2017

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 2 |
| 1.1. Rod <i>Campanula</i> L..... | 2 |
| 1.2. Izofiloidni zvončici | 3 |
| 1.3. Kompleks vrsta <i>Campanula pyramidalis</i> L... .. | 4 |
| 1.4. Cilj seminara... .. | 5 |
| 2. MOLEKULARNA FILOGENIJA KOMPLEKSA <i>C. pyramidalis</i> | 5 |
| 3. RAZVOJ MIKROSATELITNIH BILJEGA ZA VRSTE KOMPLEKSA <i>C. pyramidalis</i> | 10 |
| 4. GENETIČKA RAZNOLIKOST BALKANSKOG ENDEMA <i>Campanula secundiflora</i> | 12 |
| 5. ZAKLJUČAK | 16 |
| 6. LITERATURA | 16 |
| 7. SAŽETAK | 19 |
| 8. SUMMARY | 19 |

1. UVOD

1.1. Rod *Campanula* L

Vrste roda *Campanula* (hr. zvončiči) su jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, polugrmovi, rozetaste ili jastučaste forme. Listovi su cjelovitog ruba, naizmjenično raspoređeni, rjeđe nasuprotni, po rubu cjeloviti ili nazubljeni, bez zalistaka, sjedeći ili sa peteljka. Cvjetovi su entomofilni, dvospolni, radijalno simetrični i skupljeni u grozdaste, metličaste, klasaste ili glavičaste cvatove ili su pojedinačni. Oprašivači su najčešće solitarne pčele, a na višim nadmorskim visinama bumbari. Čaška ima pet zubaca između kojih ponekad postoji nastavci. Vjenčić je obično ljubičast, građen od pet latica koje su djelomično srasle bazalnim dijelom, dok su im gornji dijelovi slobodni (Sl. 1). Oblik vjenčića je zvonast ili ljevkast. Prašnika je pet, nisu srasli te imaju trokutasto proširene baze filamenata iznad plodnice. Plodnica je podrasla, cenokarpna, sastavljena od tri plodna lista s velikim brojem sjemenih zametaka. Vrat tučka je u gornjem dijelu dlakav, a njuška je razdijeljena na tri dijela. Plod je tobolac koji se otvara bazalnim, medijalnim ili vršnim porama. Većina predstavnika roda *Campanula* se odlikuje proteroandričnim cvjetovima (Kovačić 2006).

Rod *Campanula* je najbrojniji rod porodice Campanulaceae (Park i sur. 2006). Procjena je da se u njemu nalazi između 300 i 450 vrsta, koje su rasprostranjene od Arktika i umjerene zone severne hemisfere na jug do istočne Afrike, južne Azije i severnog Meksika (Lammers 2007). Kako su morfološki karakteri svojiti unutar roda *Campanula* jako varijablni, a više filogenetskih studija je pokazalo da je rod *Campanula* polifiletskog ili parafiletskog podrijetla, ni danas ne postoji jedna opće prihvatljiva klasifikacija cijelog roda (Kovačić 2004; 2006).

S druge strane puno uspješnije su provedena parcijalna taksonomska i filogenetska istraživanja roda, kao što su npr. agregati i kompleksi, koji su morfološki, citološki, kariološki i biogeografski dobro definirani (Lakušić i sur. 2013), a i na filogenetskim stablima obično formiraju dobro podržane monofiletske skupine. U tim istraživanjima ove manje skupine su podvrgnute multidisciplinarnim analizama (Eddie i sur. 2003) pri čemu su obično rezultati molekularnih i statističkih analiza uspoređeni s tradicionalnim sustavima klasifikacije. Ova istraživanja su omogućila razjašnjenje taksonomskih problema između evolucijski srodnih i geografsko bliskih skupina i svojiti (Kovačić 2004), a dovela su i do toga da je nekim svojitama promijenjen taksonomski status ili su prebačene u drugi rod ili vrstu (npr. Frajman & Schneeweiss 2009, Lakušić & Conti 2004).



Slika 1. *Campanula portenschlagiana* Roem. et Schult. (Portenšlagov zvončić) s poluotoka Pelješca (Snimka: Sandro Bogdanović).

Jedan od glavnih centara raznolikosti roda *Campanula* je Mediteran s oko 250 vrsta i velikim brojem endema. Balkanski poluotok i okojadransko područje kao dio istočnog Mediterana se odlikuje velikom raznolikošću roda *Campanula*. Na ovom području predstavnici roda se pojavljuju na različitim staništima, od obala do najviših planina (Kovačić 2004). Pretpostavlja se da na Balkanskom poluotoku ima značajan broj kriptičnih svojti kao i onih zapostavljenih koji su kao sinonimi uključeni u već prihvaćene svojte (npr. *C. austroadriatica* D. Lakušić & Kovačić) (Lakušić i sur. 2013). Isto tako, usprkos višegodišnjim terenskim istraživanjima Balkanskog poluotoka i dalje se pronalaze nove vrste i podvrste (Bogdanović i sur. 2014 a i b, Bogdanović i sur. 2015).

Sve ovo ukazuje na to da u taksonomskom smislu rod *Campanula* još nije proučen na zadovoljavajući način.

1.2. Izofiloidni zvončići

Unutar roda *Campanula* postoje dvije velike skupine vrsta koje se morfološki lako razlikuju po tipu listova. Jednakolistni ili izofilni zvončići su skupina vrsta koja se odlikuje postojanjem samo jednog oblika lista bilo da se radi o listovima smještenim prizemno ili na stabljici. Kod ove skupine svi listovi su srcolikog oblika i s jasno izraženim lisnim peteljka. Osim listova za ovu skupine su karakteristični uspravni tobolci koji se otvaraju s bazalnim porama i sjemenke s izraženom hrptastom lupinom. Paralelna evolucijska grana jednakolisnim zvončićima je skupina heterofilnih vrsta za koju je karakteristična heterofilija.

Bazalni listovi su srcoliki na peteljka dok su stabljični lancetasti bez peteljke. Osim u građi listova pokazalo se da između heterofilnih i izofilnih zvončića postoje i druge značajne morfološke razlike. Tako su npr. za heterofilnu skupinu karakteristični viseći tobolci i glatke sjemenke (Kovačić 2006).

Izofiloidni zvončići su manja skupina vrsta koja po svojim morfološkim osobinama predstavlja prijelaznu skupinu između izofilnih i heterofilnih zvončića. Morfološke osobine koje izofiloidni zvončići dijele s izofilnim vrstama su zvjezdasti vjenčić, uspravni tobolci, oblik zubaca čaške kao i broj kromosoma ($n = 34$). S druge strane izofiloidni zvončići imaju različito građene bazalne i stabljične listove kao i heterofilne vrste (Kovačić 2004, 2006).

Unutar izofiloidnih zvončića ubrajaju se vrste *Campanula pyramidalis* i *C. waldsteiniana*, ali i karpatski paleoendem *C. carpatica* Jacq., talijanski subendem *C. morettiana* Rchb. te insubrijski endem *C. raineri* Perpent (Park i sur. 2006, Liber i sur. 2008). Zanimljivo je kako se na filogenetskim stablima izofiloidni zvončići povezuju jače sa skupinom heterofilnih nego izofilnih zvončića pa bi možda za njih bio bolji naziv heterofiloidni zvončići (Kovačić 2006). No, bez obzira na naziv ove skupine treba imati na umu da srodstveni odnosi izofiloidnih zvončića sa drugim zvončićima i skupinama, kao i taksonomija unutar same skupine još uvijek nisu razjašnjeni te da su potrebna dodatna znanstvena istraživanja u tom smjeru (Kovačić 2006, Park i sur. 2006).

1.3. Kompleks vrsta *Campanula pyramidalis* L.

Sve vrste kompleksa *Campanula pyramidalis* imaju slabo izraženu heterofiliju, dvogodišnje su do višegodišnje biljke s jakim rizomom, stabljikom visine 40 – 200 cm, više ili manje zvjezdastim vjenčićem i cvjetovima smještenim u rahle i dugačke metličaste cvatove. Rasprostranjene su od Trsta na sjeverozapadu do planine Konjevksa (Bugarska) na istoku i otoka Peloponez na jugu (Janković i sur. 2016).

Prema dosadašnjim istraživanjima možemo reći kako je ovaj kompleks monofiletski (Park i sur. 2006, Liber i sur. 2008) te da se u njega, premda je do sada opisana čak 21 svojta, najčešće ubrajaju samo tri vrste: *Campanula pyramidalis* L., *C. secundiflora* Vis. & Pančić i *C. versicolor* Andrews (Fedorov i Kovanda 1976, Greuter i sur. 1984, Lammers 2007, Hartvig 1991, Lovašen-Eberhardt 2000, Kovačić 2004, Nikolov 2005, Nikolić, 2012).

Nedavna molekularno-sistematska istraživanja ukazuju na mogućnost postojanja većeg broja vrsta (Lakušić i sur. 2013). Isto tako dosadašnja taksonomska istraživanja ukazuju na

potrebu obimnijeg uzorkovanje te primjenu DNA-biljega bržeg evolucijskog tempa. U skladu s tim razvijeni su mikrosatelitni biljezi za vrste unutar ovog kompleksa (Radosavljević i sur. 2015) i provedena populacijsko-genetička analiza na prostoru rasprostranjenja tri vrste (Janković i sur. 2016). Dobiveni rezultati su ukazali na mogućnost postojanja više od tri vrste unutar kompleksa te potrebu daljnjih istraživanja primjenom mikrosatelitnih biljega na populacijskom uzorku cjelokupnog areala.

1.4. Cilj seminara

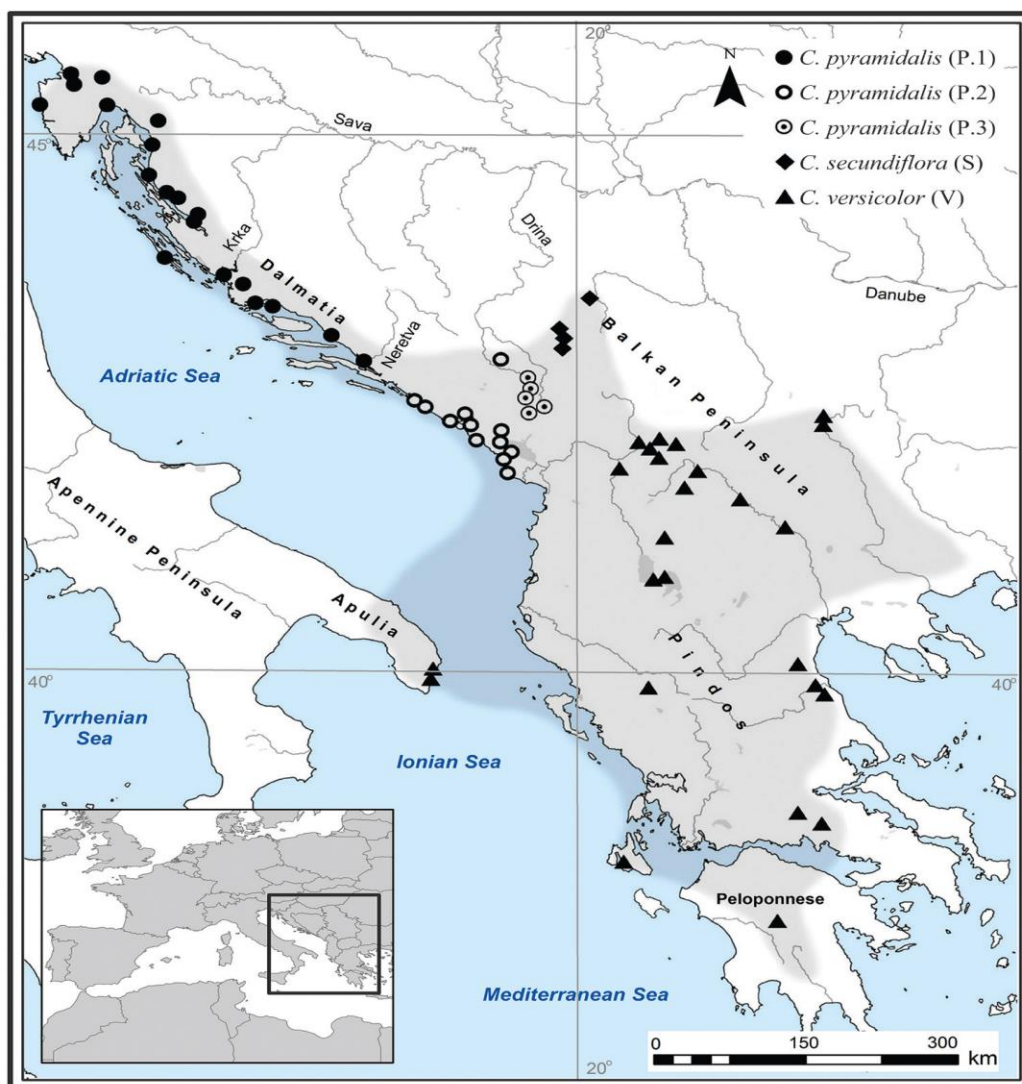
Cilj ovog seminara je prikaz recentnih istraživanja filogenetske, taksonomske i biogeografske problematike izofiloidnog kompleksa *Campanula pyramidalis* L.. U svjetskoj znanstvenoj literaturi postoje tri znanstvena rada koja se direktno tiču ove problematike, a objavljena su u posljednjih četiri godine (Lakušić i sur. 2013, Radosavljević i sur. 2015, Janković i sur. 2016). Ovaj završni seminar je svojevrstan osvrt na rezultate tih istraživanja, ali i procjena kako će izgledati istraživanja u budućnosti ako se želi konačno razriješiti filogenetska, taksonomska i biogeografska pitanja vezana uz ovaj kompleks.

2. MOLEKULARNA FILOGENIJA KOMPLEKSA *C. pyramidalis*

Jedino do sada objavljeno istraživanje filogenije kompleksa *C. pyramidalis* je ono objavljeno u znanstvenom časopisu *Taxon* (Lakušić i sur. 2013). U tom istraživanju izolirana je DNA iz lisnih uzoraka 96 biljaka koje pripadaju različitim prirodnim populacijama. Populacije su birane način da ovi uzorci ravnomjerno pokrivaju cjelokupni areal kompleksa (Sl. 2).

Istraživanje se temeljilo na proučavanju raznolikosti sekvenca DNA jedne jezgrene (eng. nuclear ribosomal internal transcribed spacers /nrITS/) i tri kloroplastne (psbA-trnH, psbZ-trnfM, trnG-trnS) nekodirajuće regije. Glavni ciljevi ovog istraživanja bili su: (1) dobiti bolji uvid u srodstvene odnose između populacija vrsta *C. pyramidalis*, *C. versicolor* and *C. secundiflora* te (2) provjeriti postoji li nekakav signal u molekularnim podacima koji bi podržao postojanje dodatnih svojiti unutar kompleksa. Nakon što je određen najvjerojatniji model po kojem su sekvence evoluirale, konstruirane su srodstvene mreže koristeći tzv. neighbor-net (NN) algoritam i srodstvena stabla koristeći dvije filogenetske metode: maksimalnu štedljivost (eng. Maximum parsimony) i Bayesovski pristup (eng. Bayesian

approach). Srodstvene mreže i srodstvena stabla konstruirana su za pojedinačne regije i za kombinirani set podataka dobiven spajanjem svih istraživanih regija DNA.



Slika 2. Karta rasprostranjenja kompleksa *Campanula pyramidalis* L. s označenim lokalitetima na kojima su skupljeni uzorci i njihovom taksonomskom pripadnošću. (preuzeto iz Lakušić et al 2013)

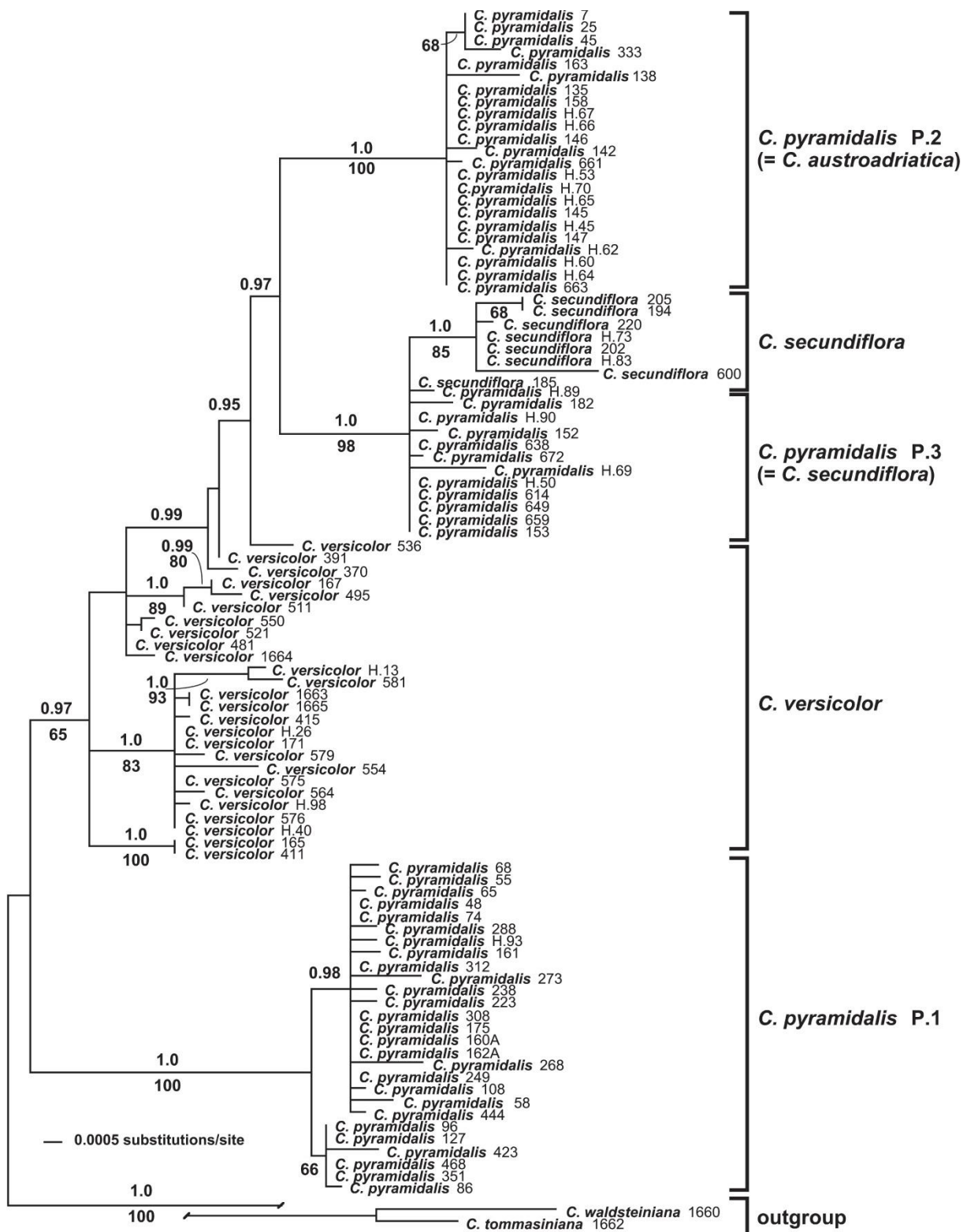
Dobiveni rezultati snažno su podržavali postojanje više od tri svojte unutar kompleksa. Naime, prije ovog istraživanja dominiralo je mišljenje da je vrsta *C. pyramidalis* s.str. rasprostranjena diljem jadranske obale i otoka, od Tršćanskog zaljeva na sjeverozapadu do sjeverne Albanije na jugoistoku. Međutim, rezultati ovog istraživanja detektirali su tri različite skupine populacija u obliku tri dobro podržane filogenetske grane u filogenetskim mrežama i stablima (Sl. 3). Dvije uočene skupine opisane su kao dvije zasebne vrste *C. pyramidalis* s.str. (P.1) i *C. austroadriatica* sp. nov. (P.2), dok se treća skupina (*Campanula pyramidalis* s.l.

(P.3)), usko srodna s vrstom *C. secundiflora*, nije dovoljno jasno odvojila da bi govorili o zasebnoj vrsti.

Utvrđena granica između dvije dobro odvojene vrste (*C. pyramidalis* s.str.; P.1 i *C. austroadriatica* sp. nov.; P.2) protezala se dolinom rijeke Neretve. Ovakav rezultat je u skladu s rezultatima nekolicine ranijih istraživanja biljnih (npr. Kučera i sur. 2008, 2010; Surina i sur. 2011) ali i životinjskih vrsta (npr. Podnar i sur. 2004, Kryštufek i sur. 2007, Sotiropoulos i sur. 2007) s ovog područja. Geološki podaci sugeriraju isušivanje sjevernog Jadrana tijekom posljednjeg ledenog doba (npr. Combourieu Nebout & al., 2002) dok je južni Jadran (tzv. Otrantski bazen) kontinuirano prisutan sve do današnjih dana. Zanimljivo je kako se granica između *C. pyramidalis* s.str. (P.1) i južno-jadranske vrste *C. austroadriatica* (P.2) u potpunosti preklapa s položajem Jadranskog mora tijekom posljednjeg ledenog doba. Zaključak je bio da dolina Neretve sama po sebi nije dovoljna barijera koja bi dovela do specijacije, nego specijaciju treba pripisati velikim ekološkim razlikama između sjevernog (kopno) i južnog Jadrana (more) u vrijeme posljednje oledbe. Ovo istraživanje je još jednom pokazalo koliko je veliki utjecaj Sredozemnog mora na vegetaciju i općenito na život u Mediteranu i susjednom područjima i kako mala kolebanja u morskoj razini mogu imati imaju snažan utjecaj na živi svijet.

U ovom istraživanju ime *Campanula pyramidalis* L. povezano je isključivo s populacijama iz sjevernojadranskog priobalja i otoka, a herbarijski primjerak LINN no. 221.12 određen je kao lektotip (<http://www.linnean-online.org/956/>). Zanimljivo je da je ovaj Linne-ov herbarijski primjerak sakupljen s kultiviranog primjerka iz Botaničkom vrtu u Uppsali (Švedska) te da nigdje nije zabilježeno njegovo prirodno podrijetlo. Zbog te činjenice nije bilo moguće odrediti prirodni lokalitet lektotipa. Od morfoloških osobina za ovu vrstu je specifičan jak odrvenjeli rizom na čijem se vrhu razvijaju karakteristične rozete listova i obično jedna do čak tri metra visoka stabljika koja na sebi nosi brojne cvjetove. Cvjetovi imaju karakteristične kratke zubiće čaške koji su zavinuti prema natrag. Biljke ove vrste žive dvije do maksimalno tri godine.

U radu je opisana nova vrsta iz južnojadranskog priobalja, a uz opis je priložena i detaljna ikonografija (Sl. 4). Kao holotip vrste *Campanula austroadriatica* D. Lakušić & Kovačić, sp. nov. je određen herbarijski primjerak iz herbarija Sveučilišta u Beogradu (BEOU) No. 31510 skupljen na lokalitetu Risan, Boka Kotorska, Republika Crna Gora. Za razliku od *C. pyradmidalis* s.str., *C. austroadriatica* je opisana kao dugoživuća biljka sa gusto isprepletenom rizomom iz kojeg izbija više uspravnih stabljika s brojnim cvjetovima. Biljke



Slika 3. Strogo dogovorno stablo dobiveno Bayesovskom analizom kombiniranih podataka kloroplastnih (psbAtrnH, psbZ-trnfM, trnG-trnS) i jezgrenih (rITS) nekodirajućih regija DNA. Srodstveno stablo dobiveno primjenom metode Maksimalne štedljivosti (MP) je imalo istu topologiju. Brojevi iznad grana označavaju Bayesovsku posteriornu vjerodostojnost, dok brojevi ispod grana predstavljaju bootstrap vrijednosti u postocima. Brojevi na kraju grana su interne oznake jedinki u analizi. (preuzeto iz Lakušić et al 2013)

ove vrste rijetko narastu preko 150 cm, a cvjetovi su im na dugačkim cvjetnim stapkama s čaškama u obliku izduženih zubića, zavinutih prema natrag.

Treći skupina populacija (*Campanula pyramidalis* s.l. (P.3)), koja se u ovom istraživanju nije jasno odvojila kao zasebna vrsta, raste u kontinentalnom dijelu Crne Gore. U radu je zaključeno da za konačne zaključke o taksonomskoj pripadnosti ovih populacija treba sakupiti mnogo veći uzorak jedinki i možda primijeniti DNA biljege bržeg evolucijskog tempa (npr. AFLP i/ili mikrosatelite).



Slika 4. *Campanula austroadriatica* D. Lakušić & Kovačić sp. nov. A, habitus; B, dio cvata; C, D, cvijet i čaška; E, prašnici prije otvaranja peludnica; F, prašnici nakon otvaranja peludnica; G, tobolac; H, sjemenka; I, listovi prizemne rozete, J, margina prizemnog lista. — Crtež: I. Janković. (preuzeto iz Lakušić i sur. 2013).

3. RAZVOJ MIKROSATELITNIH BILJEGA ZA VRSTE KOMPLEKSA *C. pyramidalis*

Tijekom filogenetskih istraživanja kompleks vrsta *C. pyramidalis* (Lakušić i sur. 2013) zaključeno je da bi za konačne zaključke o taksonomiji i filogeografiji kompleksa bilo dobro između ostalog primijeniti DNA biljege bržeg evolucijskog tempa (npr. AFLP i/ili mikrosateliti). Slijedom tog zaključka jedan dio istraživača istog tima odlučio je razviti mikrosatelitne DNA biljege (eng. Simple Sequence Repeats, skraćenica SSR) za sve vrste ovog kompleksa. Rezultati ovog istraživanja objavljeni su u časopisu *Applications in Plant Sciences* (Radosavljević i sur. 2015).

Sam postupak razvoja mikrosatelitnih biljega počeo je izolacijom ukupne stanične DNA iz silika-gel osušenog lisnog tkiva biljke skupljene na Velebitu, te njenom fragmentacijom pomoću većeg broja različitih restrikcijskih enzima kako bi se dobili fragmenti DNA veličine između 300 i 700 bp. Na krajeve restrikcijskih fragmenata su nakon restrikcijske razgradnje dodani DNA adapteri poznatog redoslijeda nukleotida. Nakon toga je provedena djelomična selekcija upotrebom hibridizacijskih membrana s DNA fragmentima mikrosatelitnih motiva. Nakon hibridizacije na membranama su ostali vezani samo oni fragmenti DNA koji su u sebi imali mikrosatelitni motiv. Ovi su fragmenti nakon oslobađanja s hibridizacijskih membrana, a zahvaljujući poznatom redoslijedu nukleotida adaptera, dodatno umnoženi PCR reakcijom. Tako dobiveni fragmenti su zatim ligacijom uneseni unutar plazmidnog vektora. Nakon toga provela se transformacija i umnažanje bakterijskih kolonija u većem broju Petrijevih zdjelica. Na ovaj način su dobivene tisuće rekombiniranih kolonija bakterija. Dijelovi bakterijskih kolonija su zatim prebačene na najlonsku membranu nakon čega je slijedila druga hibridizacija upotrebom motiv-specifičnih mikrosatelitnih sonda te skeniranje s ciljem detekcije i izdvajanja onih kolonija koje stvarno nose mikrosatelitnu sekvencu. Hibridizacijske sonde kojima se vršila detekcija mikrosatelitnih motiva u bakterijskim kolonijama su označene Cy5 ili Cy3 flourescencijskim bojama, a skeniranje je provedeno na Ettan DIGE Imager (GE Healthcare®) skeneru. Pozitivne kolonije su dodatno inkubirane u tekućem mediju kako bi im se povećao broj, a zatim je slijedilo sekvenciranje plazmida s ugrađenim mikrosatelitnim motivom te, na osnovi dobivenih sekvenci, konstrukcija PCR početnica za svaki mikrosatelitni lokus.

Ukupno je konstruirano 48 pari PCR početnica s kojima se potencijalno moglo analizirati 48 mikrosatelitnih lokusa. No kako se u praksi nikad ne dogodi da se baš svi pronađeni mikrosatelitni lokusi PCR umnožavaju ili ako se umnože ne moraju nužno biti polimorfni,

provedeno je testiranje svih lokusa umnožavanjem na manjem uzorku od pet DNA različitih jedinki, a zatim i na bitno većem broju DNA izoliranih iz 24 jedinke iz iste populacije (*C. pyramidalis* Velebit). Od 48 testiranih mikrosatelitnih lokusa njih 11 se uspješno umnožilo i pokazalo polimorfnost alela na testiranim uzorcima DNA (Tablica 1).

Tablica 1. Osobine 11 novih mikrosatelitnih biljega za vrstu *C. pyramidalis* s. str.

| Locus | Primer sequences (5'–3') | Repeat motif | Allele size range (bp) | GenBank accession no. |
|---------|---|---------------------|------------------------|-----------------------|
| CpUZ001 | F: AAGTATTGGACCCCGAGCTT R: ATCACCCCTAGCCATGCAATC | (ACT) ₈ | 130–163 | KF926847 |
| CpUZ002 | F: CCGAATGCACCGTATACTCA R: AGCAGTAAATTGGACGGTCTG | (AGA) ₉ | 155–167 | KF926848 |
| CpUZ003 | F: CCTCTCCGAATGACGCTTA R: CACTCTTGCTTACACCTTGTC | (GA) ₁₂ | 167–259 | KF926849 |
| CpUZ004 | F: GCGAGACTTCTGTGATGTGG R: TGTGGAGAAATGGACGTTCT | (AGA) ₁₂ | 133–181 | KF926850 |
| CpUZ005 | F: ATGTTTGCCCTTTTCACTGC R: TTGGGATGTTGGAACACAAA | (GT) ₁₂ | 146–160 | KF926851 |
| CpUZ006 | F: CAGCAATGCAGAAATCGAAA R: AAACCCCTTCTCTCTAAATCA | (GT) ₁₄ | 212–228 | KF926852 |
| CpUZ007 | F: TGTGGGAGGTTTCATTGGTTT R: ACTGCATGCGACAAGATCAA | (GT) ₁₆ | 200–248 | KF926853 |
| CpUZ008 | F: ATGCAGGAGCATTGAAGAT R: CCCAGGAGTCTTCTCTCC | (GT) ₁₅ | 196–204 | KF926854 |
| CpUZ009 | F: CAAATTTGAACGGGTTTTCG R: ACTCTTCCCCTCCACATTCC | (GA) ₁₉ | 181–207 | KF926855 |
| CpUZ010 | F: TCCACCCACCAATAATCTCC R: ATCCAGAACCCGAAAATTCC | (ATC) ₁₀ | 163–199 | KF926856 |
| CpUZ011 | F: ACACTGCCGATATGTGCGTA R: CCATGTTCTGTGTAATCATCA | (GT) ₁₆ | 220–246 | KF926857 |

Kako su mikrosateliti visokospecifični DNA-biljezi, upotreba PCR početnica razvijenih za jednu vrstu je moguća samo na blisko srodnim vrstama, ali i to ne mora biti u potpunosti. Budući da su mikrosatelitni biljezi za kompleks vrsta *C. pyramidalis* razvijeni proučavanjem DNA biljke s Velebita (*C. pyramidalis* s.str.; P.1; Lakušić i sur. 2013) za potrebe istraživanja cijelog kompleksa bilo ih je potrebno isprobati i u populacijama drugih vrsta (Tablica 2.).

Tablica 2. Genetske osobine 11 novih mikrosatelitnih biljega nakon primjene u prirodnim populacijama vrsta: *Campanula pyramidalis* s. str., *C. versicolor* *C. secundiflora* (A = broj alela, H_e = očekivana heterozigotnost, H_0 = primjećena heterozigotnost, n = broj analiziranih jedinki)

| Locus | <i>C. pyramidalis</i> (n = 24) | | | <i>C. secundiflora</i> (n = 24) | | | <i>C. versicolor</i> (n = 24) | | |
|---------|-----------------------------------|-------|---------|------------------------------------|-------|-------|----------------------------------|-------|---------|
| | A | H_0 | H_e^a | A | H_0 | H_e | A | H_0 | H_e^a |
| CpUZ001 | 5 | 0.458 | 0.798 | 3 | 0.136 | 0.548 | 3 | 0.625 | 0.524 |
| CpUZ002 | 5 | 0.478 | 0.629 | — | — | — | — | — | — |
| CpUZ003 | 13 | 0.864 | 0.870 | 8 | 0.714 | 0.852 | 6 | 0.217 | 0.763 |
| CpUZ004 | 8 | 0.542 | 0.770 | 4 | 0.833 | 0.703 | 5 | 0.500 | 0.758 |
| CpUZ005 | 7 | 0.727 | 0.850 | 4 | 0.500 | 0.521 | 2 | 0.167 | 0.156 |
| CpUZ006 | 8 | 0.708 | 0.790 | 6 | 0.792 | 0.808 | 5 | 0.500 | 0.660 |
| CpUZ007 | 7 | 0.454 | 0.521 | — | — | — | — | — | — |
| CpUZ008 | 4 | 0.217 | 0.686 | — | — | — | — | — | — |
| CpUZ009 | 7 | 0.652 | 0.857 | 2 | 0.227 | 0.509 | 4 | 0.542 | 0.650 |
| CpUZ010 | 5 | 0.409 | 0.734 | 5 | 0.792 | 0.762 | 6 | 0.375 | 0.607 |
| CpUZ011 | 11 | 0.913 | 0.895 | — | — | — | — | — | — |

Od 11 mikrosatelitnih biljega isprobanih na tri vrste (*C. pyramidalis* s. str., *C. versicolor* i *C. secundiflora*) uspješnim se pokazalo njih sedam (CpUZ001, CpUZ003, CpUZ004, CpUZ005, CpUZ006, CpUZ009 i CpUZ010).

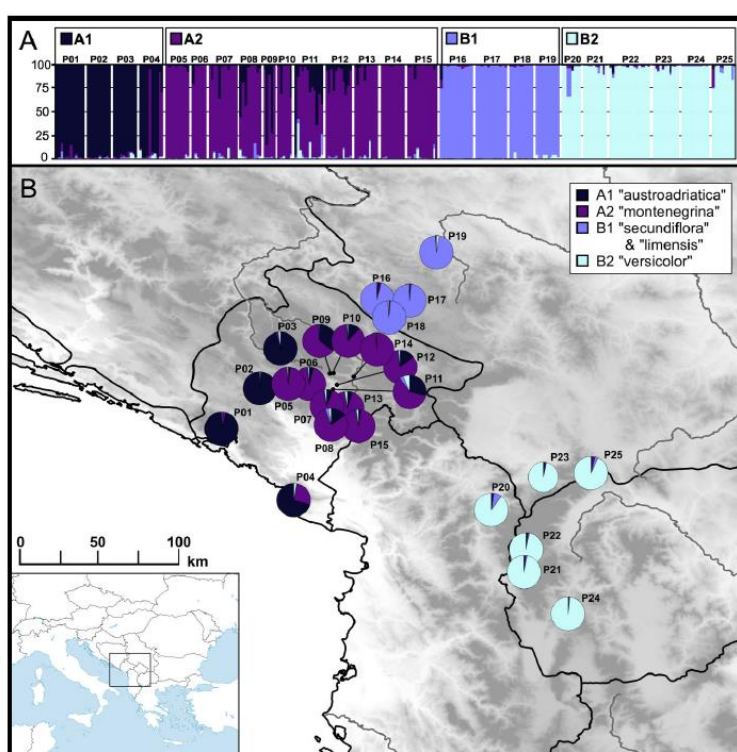
4. GENETIČKA RAZNOLIKOST BALKANSKOG ENDEMA *C. secundiflora*

Tijekom istraživanja filogenija kompleksa *Campanula pyramidalis* (Lakušić i sur 2013) treća skupina populacija (*Campanula pyramidalis* s.l. (P.3)), usko srodna s vrstom *C. secundiflora*, nije se dovoljno jasno odvojila da bi govorili o zasebnoj vrsti. U radu je zaključeno da za konačne zaključke o taksonomskoj pripadnosti ovih populacija treba sakupiti mnogo veći uzorak jedinki i možda primijeniti DNA biljege bržeg evolucijskog tempa (npr. AFLP i/ili mikrosateliti). Nakon što su za kompleks vrsta razvijeni mikrosatelitni biljezi (Radosavljević i sur. 2015) i nakon što je prikupljena 261 biljka iz 25 populacija, većinom skupine *Campanula pyramidalis* s.l. (P.3), ali i vrsta *Campanula austroadriatica* D. Lakušić & Kovačić (P.2), *C. secundiflora* Vis. & Pančić i *C. versicolor* Andrews, stvorene su pretpostavke daljnjeg taksonomskog istraživanja. Rezultati ovog istraživanja objavljeni su u časopisu Botanical Journal of the Linnean Society (Janković i sur. 2016).

Ukupne stanične DNA su izolirane iz silica gel osušenog lisnog tkiva 261 jedinke, a mikrosatelitna analiza je provedena na sedam mikrosatelitnih lokusa (CpUZ001, CpUZ003, CpUZ004, CpUZ005, CpUZ006, CpUZ009 i CpUZ010). Mikrosatelitni aleli su umnoženi upotrebom PCR protokola s tzv. touchdown inicijalnim ciklusom (Radosavljević i su. 2015). Nakon što su mikrosatelitni fragmenti za svaki lokus i svaku jedinku razdvojeni i detektirani kapilarnom elektroforezom na uređaju ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) rezultati su skorirani upotrebom računalnog programa GeneMapper (Applied Biosystems). Na mikrosatelitnim podacima je proveden veliki broj populacijsko-genetičkih analiza kako bi se testirali i odredili razni populacijsko-genetički parametri (npr. prosječan broj alela po lokusu (N_{av}), primjećena heterozigotnost (H_O); očekivana heterozigotnost (H_E), inbreeding koeficijent F_{IS} , postojanje Hardy–Weinberg ravnoteže (HWE), postojanje null alela, vjerojatnost prolaza populacija kroz genetičko usko grlo itd.). Isto tako određena je genetička struktura i srodstveni odnosi među jedinkama i populacijama upotrebom Bayesovske metode poznate pod nazivom Structure. Genetička srodnost među jedinkama i populacijama određena je izračunom tetivne udaljenosti (eng. Chord distance, Cavalli-Sforza & Edwards (1967)) i prikazana tzv. neighbor-net dijagramom.

Osim molekularnih analiza u ovom istraživanju su izvršena i morfološka mjerenja kako bi se dobio uvid u morfološke odnose istraživanih jedinki i populacija i omogućila usporedba s rezultatima analize mikrosatelita. Ukupno je obrađeno 47 kvantitativnih morfoloških osobina (građa cvijeta, listova cvatova, stabljike i sl.) na 179 jedinki iz 16 populacija.

Za sve populacije istraživane upotrebom mikrosatelitnih biljega je utvrđeno da imaju vrlo veliku genetičku raznolikost i veliku raznolikost alela na svih sedam istraživanih mikrosatelitnih lokusa. Bayes-ovska metoda Structure kao i neighbor-net dijagram bazirana na tetivnoj udaljenosti utvrdila je postojanje četiri genetički jasno odvojene skupine populacija (Sl. 5 i 6.).



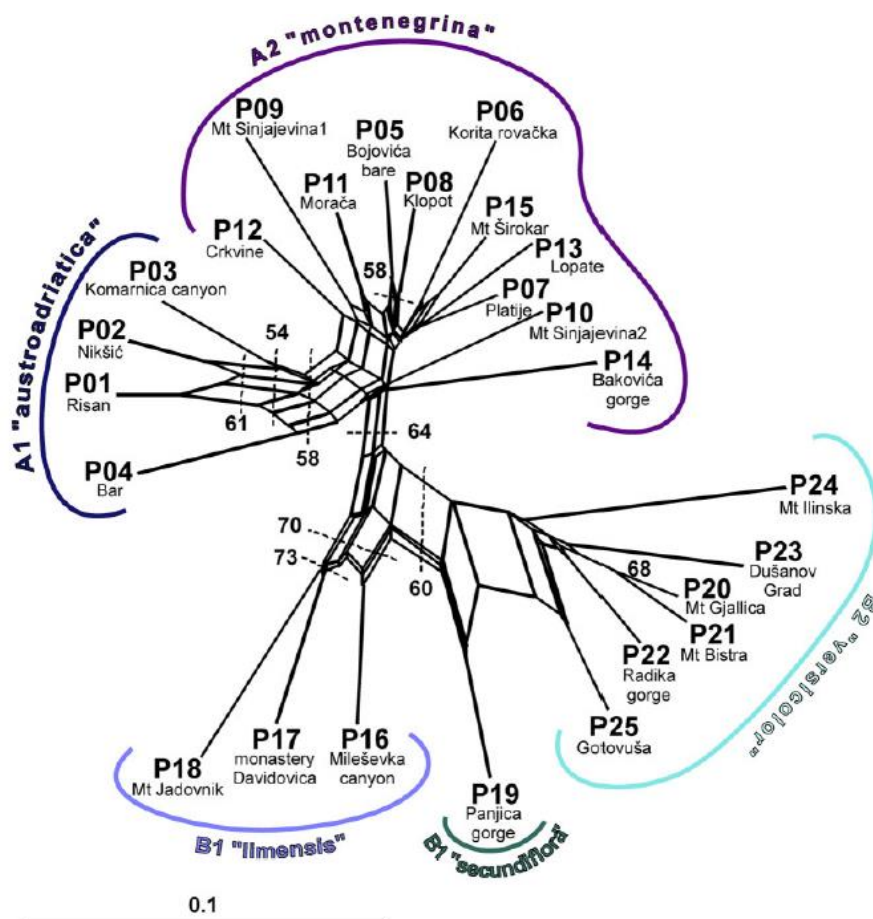
Slika 5. Populacijsko-genetička struktura temeljem Bayes-ovske procjene izvornih populacija dobivena računalnim programom STRUCTURE (preuzeto iz Janković i sur. 2016).

Budući da se genetičko odvajanje populacija *Campanula pyramidalis* s.l. (P.3) jasno podudaralo s morfološkom diferencijacijom u radu je opisana nova vrsta kompleksa *Campanula montenegrina* I.Janković & D.Lakušić, sp. nov, koja je rasprostranjena u centralnom dijelu Crne Gore i sjevernom dijelu Albanije. Novoopisana vrsta je po morfološkim osobinama između vrsta *C. secundiflora* i *C. austro-adriatica* (Sl. 7).

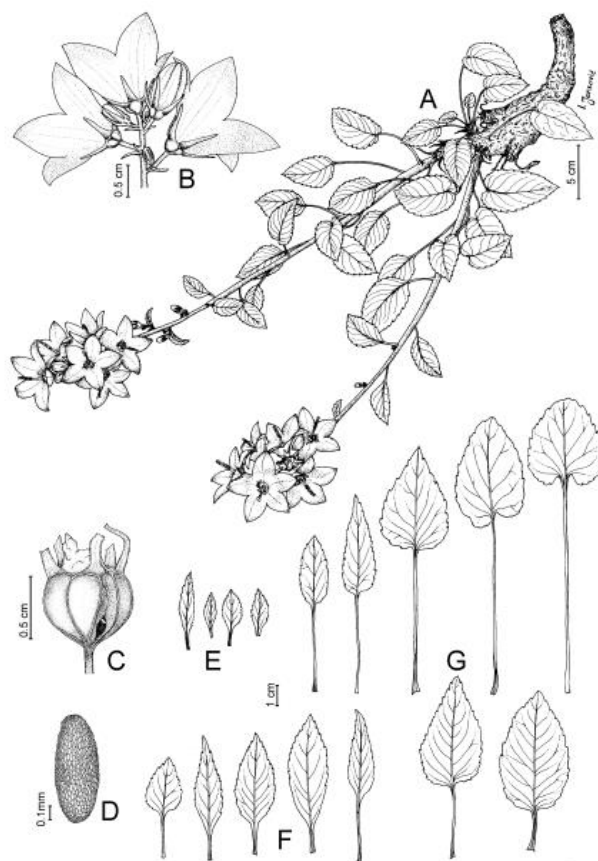
S obzirom da za vrstu *C. secundiflora* nije postojao adekvatan opis ponovo je opisana i određen joj je lektotip (PAD No. H0023203). Tijekom skupljanja materijala na terenu uočeno

je da su populacije ove vrste izrazito male i izolirane (IUCN kriterij D) s manje od 50 jedinki, na površini manjoj od 10 km (IUCN kriterij B2), izrazito fragmentirane (IUCN kriterij B(a)) sa stalnom degradacijom staništa (IUCN kriterij B(b)(iii)). Zbog svih ovih razloga, a po IUCN kriterijima, predloženo je kategoriziranje ove vrste kao kritično ugrožene.

Na kraju je važno napomenuti da je u ovaj rad uvršten ključ za determinaciju svih dosad opisanih vrsta kompleksa *Campanula pyramidalis* (Sl. 8).



Slika 6. Neighbor-net dijagram temeljen na tetivnoj udaljenosti između 25 populacija vrste *Campanula secundiflora* s.l. i usko srodnih vrsta *C. austroadriatica* i *C. versicolor*. Bootstrap vrijednosti > 50% su ispisane u blizini grana (preuzeto iz Janković i sur. 2016).



Slika 7. *Campanula montenegrina* I.Janković & D.Lakušić, sp. nov. A, habitus; B, dio cvata; C, tobolac; D, sjemenka; E, gornji listovi stabljike; F, donji listovi stabljike; G, bazalni listovi — Crtež: I. Janković (preuzeto iz Janković i sur. 2016).

1. Biennial with strong, vertical, semi-woody rhizome; calyx teeth short triangular, usually bent backwards, equal or shorter than ovary; northern and central-eastern Adriatic coast (northern Italy, Croatia) to delta and valley of Neretva river (Croatia).....*C. pyramidalis*
1. Perennial with stout, brittle woody or semi-woody stock; calyx teeth linear to triangular or subulate, erect to reflexed, 1.5–3.0 times as long as the ovary.....2
2. Stem robust, erect to ascending, 40–150 cm tall; uppermost leaves short-petiolate; inflorescence paniculate, 30–100(–120) cm long; ovary shallowly sulcate; corolla campanulate, bell-shaped; corolla lobes long triangular 10–19(–27) × 9–13(–16) mm; southern Adriatic coast from delta and valley of Neretva river (Croatia and Bosnia and Herzegovina) to Krujë in north-western Albania.....*C. austroadriatica*
2. Stem not robust, erect to pendulous, 10–90 cm tall, uppermost leaves sessile or attenuate; inflorescence paniculate to subcapitate, 5–25(–50) cm long; ovary deeply sulcate; corolla campanulate to almost rotate; corolla lobes triangular to triangular deltoid 6.0–12.0(–15.5) × 4.5–9.0(–12.5) mm.....3
3. Corolla widely campanulate to subrotate, violet to pale bluish-violet usually without dark blue eye; corolla lobes triangular deltoid 8.0–12.0(–15.5) × 6.0–9.0(–12.5) mm; central and eastern continental part of Montenegro.....*C. montenegrina*
3. Corolla subrotate to rotate, pale bluish-violet to white, usually with a dark blue eye; corolla lobes triangular 6.5–10.0(–11.5) × 4.5–7.0(–8.5) mm.....4
4. Stem ascending to erect; uppermost leaves with short pedicel or sessile; inflorescence narrowly paniculate to subcapitate; flower pedicels 0.8–6.0(–13.5) mm long; calyx teeth triangular to subulate, two to three times as long as the ovary; southern Serbia, Republic of Macedonia, Albania, south-western Bulgaria, Greece, southern Italy.....*C. versicolor*
4. Stem pendulous or erect; uppermost leaves sessile or attenuate; inflorescence paniculate with clusters and flowers oriented to one side; flower pedicels (1–)3–9(–12) mm long; calyx teeth subulate to almost linear, three times as long as the ovary; south-western Serbia and north-eastern Montenegro.....*C. secundiflora*

Slika 8. Ključ za determinaciju svih dosad opisanih vrsta kompleksa *Campanula pyramidalis*

5. ZAKLJUČAK

Nakon objave rezultata istraživanja u ova tri znanstvena rada može se zaključiti da je taksonomska i biogeografska slika kompleksa *C. pyramidalis* sada puno jasnija, no za konačno razjašnjenje svih nedoumica čini se presudnim sakupiti veliki populacijski uzorak svih ikad zabilježenih svojti i na njemu provesti molekularnu analizu primjenom mikrosatelitnih i AFLP biljega. Isto tako bilo bi poželjno na takvom uzorku ponovo provesti filogenetska istraživanja proučavanjem kloroplastnih i jezgrenih DNA regija.

6. LITERATURA

- Bogdanović S, Brullo S, Rešetnik I, Lakušić D, Šatović Z, Liber Z, 2014a. *Campanula skanderbegii*: molecular and morphological evidence of a new *Campanula* species (Campanulaceae) endemic to Albania. *Systematic Botany*, 39, 1250–1260.
- Bogdanović S, Brullo S, Rešetnik I, Šatović Z, Liber Z, 2014b. *Campanula teutana*, a new isophyllous *Campanula* (Campanulaceae) from the Adriatic region. *Phytotaxa*, 162, 1–17.
- Bogdanović S, Rešetnik I, Brullo S, Shuka L, 2015. *Campanula aureliana* (Campanulaceae), a new species from Albania. *Plant Systematics and Evolution*, 301, 1555–1567.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF, 1967. Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, 19(3, 1. dio), 233–257.
- Combourieu Nebout N, Turon JL, Zahn R, Capotondi L, Londeix L, Pahnke K, 2002. Enhanced aridity and atmospheric high-pressure stability over the western Mediterranean during the North Atlantic cold events of the past 50 k.y. *Geology*, 30, 863–866.
- Eddie WMM, Shulkina T, Gaskin J, Haberle RC, Jansen RK, 2003. Phylogeny of Campanulaceae s.str. inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 90, 554–575.
- Fedorov AA, Kovanda M, 1976. *Campanula* L. U: *Flora Europaea* 4. Ur. Tutin TG, Burges NA, Chater AO, Edmondson JR, Heywood VH, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, Cambridge University Press, Cambridge, 4–93.

- Frajman B, Schneeweiss GM, 2009. A campanulaceous fate: the Albanian stenoendemic *Asyneuma comosiforme* in fact belongs to isophyllous *Campanula*. *Systematic Botany*, 34, 595–601.
- Greuter W, Burdet H.M, Long G, 1984. *Med-Checklist*, vol. 1. Geneva: Conservatoire et Jardin Botanique.
- Hartvig P, 1991. *Campanula* L. U: *Mountain flora of Greece*, vol. 2. Ur. Strid. A. & Tan, K., Edinburgh University Press, Edinburgh, 369–387.
- Janković I, Šatović Z, Liber Z, Kuzmanović N, Radosavljević I, Lakušić D, 2016. Genetic diversity and morphological variability in the Balkan endemic *Campanula secundiflora* s.l. (Campanulaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 180 (1), 64–88.
- Kovačić S, 2004. The genus *Campanula* L. (Campanulaceae) in Croatia, circum-Adriatic and west Balkan region. *Acta Botanica Croatica*, 63(2), 171-202.
- Kovačić S, 2006. Relationships and chorology of isophyllous and heterophyllous bluebells (*Campanula* L., Campanulaceae) in Adriatic Dinarids. *Doktorski rad*, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska.
- Kučera J, Tremetsberger K, Vojta J, Marhold K, 2008. Molecular study of the Cardamine maritima group (Brassicaceae) from the Balkan and Apennine Peninsulas based on amplified fragment length polymorphism. *Plant Systematics and Evolution*, 275, 193–207.
- Kučera J, Marhold K, Lihová J, 2010. Cardamine maritima group (Brassicaceae) in the amphi-Adriatic area: A hotspot of species diversity revealed by DNA sequences and morphological variation. *Taxon*, 59, 148–164.
- Kryštufek B, Buzan EV, Hutchinson WF, Hänfling B, 2007. Phylogeography of the rare Balkan endemic Martino's vole, *Dinaromys bogdanovi*, reveals strong differentiation within the western Balkan Peninsula. *Molecular Ecology*, 16, 1221–1232.
- Lakušić D, Conti F, 2004. *Asyneuma pichleri* (Campanulaceae), a neglected species of the Balkan peninsula. *Plant Systematics and Evolution*, 247, 23–36.
- Lakušić D, Liber Z, Nikolić T, Surina B, Kovačić S, Bogdanović S, Stefanović S, 2013. Molecular phylogeny of the *Campanula pyramidalis* species complex (Campanulaceae) inferred from chloroplast and nuclear non-coding sequences and its taxonomic implications. *Taxon*, 62 (3), 505 – 524.

- Lammers TG, 2007. Campanulaceae. U: The Families and Genera of Vascular Plants 8: Flowering Plants, Eudicots, Asterales. Ur. Joachim J, Jadereit W, Springer, Berlin, 26–56.
- Liber Z, Kovačić S, Nikolić T, Likić S, Rusak G, 2008. Relations between western Balkan endemic *Campanula* L. (Campanulaceae) lineages: Evidence from chloroplast DNA. *Plant Biosystems*, 142, 40–50.
- Lovašen-Eberhardt Ž, 2000. Campanulaceae - Popis flore Hrvatske, 3. dio // *Natura Croatica : periodicum Musei historiae naturalis Croatici* = časopis Hrvatskoga prirodoslovnog muzeja, 64-69.
- Nikolov Z, 2005. Taxonomy and chorology of the genus *Campanula* L. (Campanulaceae) in the Skopje basin. Diplomski rad, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet “Sv. Kiril i Metodij”, Skopje, Makedonija.
- Nikolić T, (Ur.) 2012. Flora Croatica Database. Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska. <http://hirc.botanic.hr/fcd>
- Park J M, Kovačić S, Liber Z, Eddie W M, Schneeweiss G M, 2006. Phylogeny and biogeography of isophyllous species of *Campanula* (Campanulaceae) in the Mediterranean area. *Systematic Botany*, 31(4), 862-880.
- Podnar M, Mayer W, Tvrtković N, 2004. Mitochondrial phylogeography of the Dalmatian wall lizard, *Podarcis melisellensis* (Lacertidae). *Organisms Diversity & Evolution*, 4, 307–317.
- Radosavljević I, Jakse J, Šatović Z, Javornik B, Janković I, Liber Z, 2015. New microsatellite markers for *Campanula pyramidalis* (Campanulaceae) and cross-amplification in closely related species. *Applications in Plant Sciences* 3(3), apps.1400117. <http://doi.org/10.3732/apps.1400117>
- Sotiropoulos K, Eleftherakos K, Džukić G, Kalezić ML, Legakis A, Polymeni RM, 2007. Phylogeny and biogeography of the alpine newt *Mesotriton alpestris* (Salamandridae, Caudata), inferred from mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45, 211–226.
- Surina B, Schönswetter P, Schneeweiss GM, 2011. Quaternary range dynamics of ecologically divergent species (*Edraianthus serpyllifolius* and *E. tenuifolius*, Campanulaceae) within the Balkan refugium. *Journal of Biogeography*, 38, 1381–1393.

7. SAŽETAK

Cilj ovog završnog rada je bio prikaz recentnih istraživanja filogenetske, taksonomske i biogeografske problematike kompleksa *Campanula pyramidalis*. U svjetskoj znanstvenoj literaturi postoje tri znanstvena rada koja se direktno tiču ove problematike, a objavljena su u posljednjih četiri godine (Lakušić i sur. 2013, Radosavljević i sur. 2015, Janković i sur. 2016). Ovaj završni seminar je svojevrstan osvrt na rezultate tih istraživanja i procjena kako provesti buduća istraživanja ako se žele konačno razriješiti filogenetske, taksonomske i biogeografske nejasnoće vezana uz ovaj kompleks.

8. SUMMARY

The aim of this final seminar was to present recent studies of the phylogenetic, taxonomic and biogeographic issues of the *Campanula pyramidalis* complex. In the world scientific literature there are three scientific papers dealing directly with these issues and have been published in the last four years (Lakušić et al. 2013, Radosavljević et al., 2015, Janković et al., 2016). This final seminar is a kind of overview on the results of these papers and an estimate of how to manage future research if we want to finally solve phylogenetic, taxonomic and biogeographic ambiguities related to this complex.